

薄层细胞培养技术在植物形态分化研究中的应用

田增胜 (山东省临沂市兰山区农业局, 山东临沂 276003)

摘要 综述TCL在研究激素等因素对形态分化的影响、形态分化中蛋白质等物质的动态变化、TCL在细胞学研究及其在分子生物学研究中的应用, 并指出TCL应用中存在的主要问题。

关键词 TCL; 应用; 研究

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)19-4861-04

Application of TCL in the Research on Morphogenesis

TIAN Zeng-sheng (Agriculture Bureau of Lanshan District, Linyi, Shandong 276003)

Abstract The application of TCL in morphogenesis, cytology and molecular biology were reviewed. In this review the effect of plant hormone and other factors on morphogenesis and the changes of protein and other substance during morphogenesis was focused. At last the main problems of the application of TCL were raised.

Key words TCL; Application; Research

薄层细胞培养(TCL, thin cell layer culture), 最初是指从外植体表皮部位撕下长5 mm、宽1 mm、厚3~6层细胞(包括表皮层细胞和数层薄壁细胞)接种于适宜的培养基中进行培养的方法, 而现在将把外植体横切成大约1 mm厚的薄片进行培养的方法, 统称为薄层培养(transverse TCL, tTCL)。它最早是由Tan Than Van在1970年以*Nautilocalyx lynchii*的表皮组织为外植体, 获得根和芽的分化, 建立的一种培养系统。张丕方等(1989)利用TCL系统对植物形态发生过程进行活体连续观察。Madsen等(1998)建立以茎节切片为外植体的nTCL(nodal TCL)再生系统^[1-3]。

目前, 利用薄层细胞培养系统, 在植物的形态发生、分子生物学、细胞学和再生系统等方面的研究取得了重要进展。大量的研究工作证明了薄层细胞培养系统确实是一个可控制的良好实验系统。笔者针对目前对薄层细胞培养在各方面的应用进行综述。

1 薄层细胞培养在植物形态发生中的应用

1.1 利用TCL系统进行器官分化培养 据不完全统计, 已有十几个属的植物进行了薄层细胞培养。如: 烟草属(*Nicotiana*)、海棠属(*Begonia*)、芸苔属(*Nautilocalyx*, *Saintpaulia*, *Brassica*)、鸢尾属(*Iris pallida*)、甜菜属(*Betavulgaris*)、田菁属(*Sesbania*)、芭蕉属(*Musa*)等。植物的各个部分都可以用作薄层细胞培养的外植体, 如: 茎、叶、花梗、叶柄、花序轴、茎尖、花序的苞叶、花瓣等。不同来源的薄层外植体在培养基与环境的调控下, 表现出不同的分化途径。迄今为止, 利用TCL培养直接获得的器官分化有花芽(韩碧文等, 1993; 许萍等, 1997; Chen等, 1995; Morgan等, 1984)、营养芽(Tan等, 1985; 陈永宁等, 1989)、根(许萍等, 1997; Abeshaim等, 1985; Tan等, 1985)、单细胞毛(Tan等, 1980)、表皮毛(许萍等, 1997; Tan等, 1985)、气孔(许萍等, 1997)等, 几乎涉及到了所有的器官。因此可以认为薄层细胞培养是研究形态发生的一个较理想的实验体系^[4-8]。

1.2 利用TCL系统研究外源植物激素对形态分化的影响

离体形态发生是组织培养、原生质体培养、遗传转化、无性

系变异与突变体筛选的基础。研究表明, 在形态分化的诸多影响因子中, 植物激素起着重要的作用。各类植物激素的生理作用虽然具有相对专一性, 但是植物的各种生理效应(包括形态发生)是不同激素之间相互作用的综合表现。

1.2.1 生长素和细胞分裂素对形态分化的影响。 离体培养条件下, 植物细胞不能合成生长素和细胞分裂素, 但细胞的分裂、分化及形态建成又必须有这两种激素的共同作用, 因此在植物组织培养中, 外源生长素和细胞分裂素是必须的激素。两者的浓度配比或先后使用的次序, 是诱导细胞分裂和生长, 控制细胞分化和形态发生的关键因子之一。

Tan(1973)在烟草(*Nicotiana tabacum* Wisconsin 38)的花茎段表皮薄层细胞培养中, 通过调节培养基中生长素与细胞分裂素的比例及糖的浓度, 在外植体上直接诱导分化出花芽、营养芽、根及愈伤组织。Tan等(1974)报道, 用烟草花枝表皮层细胞培养时, 在光下诱导各种器官分化的最佳条件是用IAA 1.0 $\mu\text{mol/L}$ + Kin 1.0 $\mu\text{mol/L}$ + 蔗糖3%诱导花芽, 用IAA 1.0 $\mu\text{mol/L}$ + 6-BA 10 $\mu\text{mol/L}$ + 蔗糖3%诱导营养芽, 用IBA 10 $\mu\text{mol/L}$ + Kin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ + 蔗糖1%诱导根。在黑暗条件下诱导愈伤组织的最适条件是2,4-D 5 $\mu\text{mol/L}$ + Kin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ + 蔗糖3%。Dung等(2001)用tTCL培养麝香百合(*Lilium longiflorum*)幼茎时发现, NAA 5.4 $\mu\text{mol/L}$ 诱导小鳞茎的发生, 2,4-D 2.2 $\mu\text{mol/L}$ 诱导根的发生, IBA 1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 分别诱导芽和小鳞茎的发生, TDZ 1.1、2.2 $\mu\text{mol/L}$ 分别诱导原球茎和芽的发生^[9-11]。

许萍等(1997)以烟草茎表皮细胞为外植体, 在附加了6-BA 2 $\mu\text{g/L}$ + NAA 0.2 $\mu\text{g/L}$ 的MS液体培养基的微室中培养10 d后, 在愈伤组织的一些部分, 形成根的分生中心, 进而形成突起的根原基; 继续培养, 则发育形成成熟的根。花茎表皮经MS + 6-BA 2 $\mu\text{g/L}$ + NAA 0.2 $\mu\text{g/L}$ 培养7 d后, 形成愈伤组织; 转移到含0.1 $\mu\text{g/L}$ ZT的培养基上时, 分化出许多花原基; 花原基突起比较平坦。接着花器开始分化, 花原基顶端萼片原基呈裂瓣状; 随后可以看到正在分化的花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊心皮等, 再生长下去, 则长成完整的花苞; 移至MS基本培养基上, 便可发育为正常的试管花朵^[8]。

Van等(1984)在烟草(*N. tabacum* CV. Samson)的果柄薄层细胞培养中, 进一步看到了激素对花芽形成的影响。实验

作者简介 田增胜(1974-), 男, 山东临沂人, 硕士, 助理农艺师, 从事果树育种及新技术推广工作。

收稿日期 2006-04-10

结果表明,花芽的分化主要取决于细胞分裂素类激素的浓度,而生长素类激素的辅助效应则较复杂。在培养的早期,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 NAA 减少花芽的形成和延缓花芽的发育,而在培养的后期,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 NAA 却促进花芽生长。因此,先把外植体在含有低浓度的 NAA 的培养基中预培养 3~5 d,然后转移到含有较高浓度 NAA 的培养基中,效果最好。采用预培养的方式,还确定了激素作用的时间(即先在含有适宜花芽分化的激素浓度的培养基中培养几天,然后转移到不适宜分化的低浓度激素的培养基中)。只要预培养 3 d(一直培养在含有适宜激素浓度的培养基中),花芽形成率就能达到对照的 $1/2^{[12]}$ 。

在烟草革新一号和粘烟草的薄层培养中,还观察到激素诱导器官分化时出现的极性现象。培养基中 IAA 和 KT 的浓度相等(1.0 $\mu\text{mol/L}$) 时,花芽原基发生在外植体的形态学下端。KT 浓度提高(10 $\mu\text{mol/L}$) 则两端均发生营养芽原基,KT 浓度降低(0.1 或 0.5 $\mu\text{mol/L}$) 则两端发生愈伤组织,极性消失。这种极性现象可能与激素的极性分布和由之引起的生化物质(如成花因子)的移动有关。

Bi 等(1999) 试验发现,10 $\mu\text{mol/L}$ N-(2-氯-4-吡基)-N-苯基脲(CPPU) 可诱导钻兰(*Rhynchosyris gigantea*) tTCL 再生芽和根。Bi 等(1999) 以离体培养的麝香百合(*Lilium longiflorum*) 假鳞茎 tTCL 为外植体,在含有 1、3 $\mu\text{mol/L}$ CPPU 的培养基上每个外植体分别产生 16.81、16.26 个芽。大量研究发现,不同种类的细胞分裂素组合诱导形态发生比单独使用某一类细胞分裂素更有效。Bi 等(1999) 试验发现 TDZ 和 BA 组合式用对枳壳(*Poncirus trifoliata*) tTCL 的响应和芽的再生比两者单独使用更有效^[13-15]。

李文安等(1989) 试验表明,以 MS 为基本培养基,附加 IBA 2 ng/L + 6-BA 0.2 ng/L 能够促进花芽提早分化,最短仅用 12 d 就可形成花芽^[5]。

1.2.2 其他激素对形态分化的影响。Rajeevan 等(1987) 试验发现 GA_3 抑制 TCL 的花芽分化,Bi 等(1999) 试验发现 GA_3 能够促进 TCL 的营养芽的伸长。大量研究表明,外源亚精胺能够促进 TCL 花芽分化。Fu 等(2000) 试验发现,烟草花梗 TCL 在营养芽诱导培养基中添加 0.5~5 $\mu\text{mol/L}$ 的亚精胺能够诱导花芽的产生,否则没有花芽的产生;添加 20 $\mu\text{mol/L}$ 环己胺(亚精胺合成抑制剂) 则没有花芽分化,诱导营养芽分化,提高外源亚精胺的浓度可以逆转抑制作用^[16]。

1.3 利用 TCL 研究在形态分化中内源激素的动态变化

李颖章等(1996) 报道,菊苣花梗薄层培养于 MS 附加 NAA、BA 或 IAA、BA 的培养基上有花芽或营养芽分化。花芽分化中内源 IAA、DHZ + DHZR、iPA 含量明显增加,而 Z + ZR 变化不明显。营养芽分化中内源细胞分裂素含量增加明显,而 IAA 在培养前 7 d 含量下降,随后有所增加,在原基形成时含量达原初水平的 $2/3$ 。可见,花芽分化比营养芽分化所需内源 IAA/CTK 比值要高。李颖章等(1995) 报道,菊苣花梗薄层培养开始的 0~7 d,IAA 含量缓慢增加;7~10 d,IAA 含量迅速增加,第 10 天达到高峰,是原初培养时的 6 倍多,之后又迅速下降。培养 10~13 d 时的外植体表面出现乳状突起的不定根原基。不定根形成前后,IAA 含量变化明显不同。所测定

的 3 种细胞分裂素在根形成中变化不同。Z + ZR 含量一直在缓慢下降;DHE + DHZR 在 0~10 d 含量一直在下降,第 10 天达最低值,随后稍有增加;iPA 含量变化较大,0~10 d,含量维持稳,但 10~13 d 含量急剧上升,增加了 5 倍多,随后又急速下降^[17,18]。

Fu 等(2000) 报道,“Sansun”烟草 TCL 在花芽形成过程中内源玉米赤霉烯酮(ZEN) 水平出现 2 个峰值,加入 ZEN 生物合成抑制剂马拉硫磷(MAL) 后,内源 ZEN 水平下降,新花芽的合成受阻,而添加外源 ZEN 可再诱导新花芽的发生,表明 ZEN 对花芽的发生有促进作用。Gendy 等(1993) 研究发现,烟草 TCL 根的分化,与培养第 7 天腐胺的合成高峰相关,腐胺(亚精胺+精胺) 比值下降时,根分化受到抑制;在培养 4、10 d 分别添加外源腐胺或亚精胺,只有在含有腐胺的培养基上才有根的分化,而且培养过程中尤其培养的第 7 天培养基 pH 值的变化对腐胺的诱导效应必不可少^[19]。

1.4 利用 TCL 研究形态分化中蛋白质等物质的动态变化

李颖章等(1994) 报道,有表皮外植体在培养的 13 d 时蛋白质含量达高峰,由原初的 8.6 ng/g FW 增加到 12.3 ng/g FW,随后缓慢下降,在 27 d 时降为 7.8 ng/g FW,可见,在形成花芽时,外植体中可溶性蛋白质的含量高峰出现在花芽原基的形成期;而作为对照的去表皮后的外植体蛋白质含量无明显变化,由此说明,花芽的产生伴随体内有大量蛋白质的合成。用聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步分离蛋白质,发现在花芽分化时有特异性的蛋白条带出现,该蛋白的特性及生理功能有待进一步研究^[20]。

1.5 利用 TCL 研究器官分化的影响因素 薄层细胞培养的分化方向因供体植株的生理状态(是否处于开花期)、倍性、取材部位、生理生化因素及物理因素(光、温度)等的不同而不同。

李文安等(1989) 试验发现烟草不同器官薄层离体培养形成花芽受植株生长发育时期的影响。植株处于营养生长期,茎表皮薄层无花芽分化能力。随着植株营养生长转向生殖生长,在抽苔、现蕾、开花、结籽不同发育阶段,主茎上不同部位的茎表皮出现花芽的频率不同。植株现蕾时,只有接近顶端第 1 节的茎薄层出现花芽分化,随植株的发育,逐渐延伸到 4、5 节。植株果实成熟时,主茎薄层分化花芽能力又复减弱。花芽分化的趋势却向花序分枝、花柄、果柄延伸,使它们的薄层组织有分化花芽能力。他们研究中还发现培养基附加不同配比的植物激素对薄层花芽分化有促进作用^[5]。

曹国仪等(1988) 研究发现 1 $\mu\text{mol/L}$ IBA 或 IAA 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 激动素对花芽的诱导最适宜。Tan(1974) 发现当生长素/细胞分裂素比值降低时,诱导出营养芽,没有花芽形成。当两者浓度均降低时,尽管其比例为 1,仍观察不到花芽形成。在为 30 g/L 蔗糖时,发现细胞分裂素(玉米素、激动素、BA 等) 中激动素对诱导花芽的形成最有效^[21]。

Tan 等(1977) 报道,培养基中的碳水化合物的种类和用量也决定形态建成。在无糖的“成花培养基”上不能形成花,而形成营养芽,且时间推迟到 3 周后才出现少量花芽。Tan 等(1980) 和 Van(1984) 将外植体在 0、2、4、6、8、10 d 时转移到含糖(30 g/L) 或不含糖的培养基中,在 6~10 d 时缺少碳水化

合物会导致分生组织膨大和功能的异常改变。这表明诱导花芽形成后期需要碳水化合物^[22]。

Fran(1974,1977,1980) 报道, 温度对诱导毛叶秋海棠表皮细胞形成单细胞毛的影响较大。在27℃下培养7 d, 外植体90%形成单细胞毛。22℃时单细胞毛的分化明显减弱。在17℃时仅有少数外植体形成单细胞毛。低于17℃单细胞毛的形成完全抑制。昼夜在32~27℃则部分抑制, 仅有50%外植体有单细胞毛的起始, 但进一步的发育受阻。温度的效应在培养的前2 d 最有效。供体植株的温度也影响外植体的形态建成。温度效应可能改变内源物质的含量及膜脂质组成而使形态建成反应不同。

Chyah 等(1974) 以蓝猪耳为材料, 试验表明, 单一培养表皮细胞48 h 后死亡; 单一培养亚表皮层外植体能形成根, 但没有芽; 在完整茎段组成上没有形态建成能力的亚表皮薄壁组织, 在离体后有形成根的能力; 表皮和亚表皮薄壁组织一起培养, 即使有一层薄壁细胞的外植体也可再生根和芽; 无表皮茎段可形成根, 即使提高激动素浓度(100 μmol/L), 也不形成芽; 如果将离体的表皮再放回茎段的原位一同培养时, 也有芽形成。结果证明了“细胞接触”在分化中具有很重要的作用。表皮形成芽的能力只有在直接或间接与亚表皮层接触才能表现。也证明在组织之间存在着拮抗关系。一旦解脱这种关系, 摆脱了组织的生理相关抑制, 离体的细胞层就可建立新的生理平衡, 表现它们的潜能^[6]。

周吉源等(1992) 报道, 油菜(*Brassica napus* L.) 在相同或不同的培养基上, 不同光质愈伤组织的诱导效应都不同, 蓝光, 红光对油菜愈伤组织诱导具有明显的促进作用; 在相同培养基中, 不同光质处理对愈伤组织的增殖效应也不同, 蓝光、红光对愈伤组织增殖的促进作用也是明显的^[13]。

2 薄层培养在细胞学研究中的应用

2.1 器官分化起源的研究 薄层培养的细胞数目比较少, 可以很方便地观察到器官分化的起源。Fran(1970) 年在 *Nautilocalyx lychei* L. 的薄层培养中观察到芽和根均起源于表皮。Fran(1980) 以‘Wisconsin 38’烟草为材料, 通过组织解剖、电镜观察等方式证明了花茎薄层直接分化花芽和愈伤组织形成的起源部位是亚表皮细胞。Van(1984) 观察到该层细胞同时进行平周分裂和垂周分裂, 形成分裂中心, 而后向花芽方向分化。在蓝猪耳的TCL中, 根起源于薄壁组织细胞, 芽起源于表皮或亚表皮细胞。其他许多实验也表明表皮层或少数几层亚表皮细胞具有很强的器官发生潜能(Gregory 等, 1995)。它们可以不经过愈伤组织阶段而直接分化成芽、根或体细胞胚。说明了表皮细胞较容易在离体时表达全能性。Chyah 等(1974) 在蓝猪耳的薄层培养中, 发现根起源于薄壁组织细胞, 芽起源于表皮或亚表皮细胞^[6,12]。

过全生(1997) 试验发现杂交杨(*Populus nigra* var *betulifolia* × *P. trichocarpe*) 叶片主脉的愈伤组织主要由维管束鞘薄壁细胞, 以及与其邻接的一些栅栏组织细胞和韧皮部的薄壁细胞分裂而来。不定芽通常发生在愈伤组织的周边区, 也可以起源于维管组织结节(vascular nodules) 周围的形成层状细胞。侧脉的维管束鞘细胞分裂活动很强, 可不经愈伤组织直接长成不定芽^[23]。

2.2 细胞分裂的动态观察 过全生(1997) 认为杂交杨(*Populus nigra* var *betulifolia* × *P. trichocarpe*) 叶片位于主脉维管束两侧中上部的维管束鞘薄壁细胞首先启动分裂, 几乎同时, 与其邻接的一些栅栏组织细胞也分裂, 并很快形成胚性分生细胞团^[23]。

陆文楔等(1986) 认为, 烟草表皮细胞中微丝鞘在染色质分裂时消失, 直至分开后微丝鞘才重新聚合排列, 形成2个子核的丝鞘。张丕方等(1989) 通过活体连续观察, 结合DNA活体测量, 发现烟草表皮细胞在培养24 h 后, 核明显增大, 核质变浓, DNA 含量显著增加, 细胞质变浓厚, 运动加速, 细胞器也随之加速运动。通过这些变化, 细胞完成了脱分化, 回到了细胞周期的间期, 并开始进行有丝分裂^[7]。

许萍等(1997) 对烟草茎表皮细胞薄层培养物的细胞核进行活体染色, 发现在培养早期, 细胞核发生了明显变化, 由分化时的一般扁圆形和靠壁的位置逐渐变成圆形和居中的位置; 核体积增大; 染色质结构由致密变得疏松; 而后染色质凝缩, 发生无丝分裂, 经数次分裂之后, 细胞形态较一致。通过单细胞核内DNA含量的测定, 发现细胞分裂之前, 核DNA含量并不增加, 而最初几次分裂之后, 含量减少, 直到细胞大小一致, 分裂较同步时, 才恢复到较恒定的水平。许萍等(1997) 通过采用Hechst 33258 和TRITC-Phalloidin 2 种染色液对烟草茎表皮薄层培养细胞进行非固定染色观察, 发现细胞无丝分裂过程中核及其外围微丝鞘发生了很大变化, 染色质在分裂时形成卷曲拉裂状, 此时核外微丝鞘完全消失, 直至染色质分开后, 两组染色质由伸张状态回缩时, 微丝鞘才重新聚合排列, 并最终形成两个子核的微丝鞘^[24,25]。

周吉源等(1991) 以油菜(*Brassica napus* L.) 花序轴为材料, 切取表皮及亚表皮接种于附加不同浓度和比例的NAA和6-BA的MS培养基上培养, 观察细胞启动、细胞分裂及细胞分化的过程。结果表明, 亚表皮细胞和表皮细胞均可启动并分裂, 形成分生细胞团或分生细胞层; 器官发生有直接器官发生型和间接器官发生型2 种类型^[26]。

李颖章等(1997) 在菊苣(*Gichorium intybus* L.) 花梗薄层培养花芽分化细胞超微结构的观察表明, 在花芽原基的形成中细胞内线粒体、高尔基体、内质网、核糖体大量增加, 且始终可见线粒体的分裂增殖, 大量增加的线粒体为内质网、高尔基体的活动提供能量, 内质网和高尔基体为花芽分化合成新的结构蛋白和新的功能蛋白; 花芽分化是一个强烈的代谢过程; 壁旁体多处可见, 且常与内质网、高尔基体相邻分布, 其功能可能与物质运输有关^[27]。

3 TCL 在分子生物学研究中的应用

3.1 在分子水平研究器官分化 自从19世纪末德国生物学家Wijel m Roux 创立发育生物学以来, 植物发育生物学主要是进行形态发生的宏观研究, 而有关发育的内在机制、器官发生的细节等问题, 基本上是在20世纪50年代以后才得以深入研究的。现在人们已经知道, 所有体细胞内的遗传信息都完全相同, 发育的实质就是基因在不同时空位置选择性表达, 从而产生不同的细胞、组织和器官。

Meeks 等(1989) 利用烟草薄层实验系统先采用不同的激素配比, 得到了营养生长的茎芽分化和直接诱导成的花芽原

基,然后从成花的薄层中提出特异的 mRNA,制备了一些 cDNA 克隆,发现其中有几个可与正常植株花芽分化时的 mRNA 相对应,说明离体薄层细胞中与花芽分化有关的基因也存在于正常植物的分化花芽的细胞中。在花芽分生组织形成前期,它们在根中表达最大,说明根在成花中的作用亦不可忽视。有些基因只在外植体薄层细胞发生花芽分化时才表达,而在营养生长的茎芽组织中不表达^[28]。

曹国仪等(1988)在薄层培养中观察到花芽与营养芽细胞核中 DNA 的含量差异很大,呈梯度分布。Altamura 等(1986)发现烟草开花枝与主枝 TCL 细胞核中 DNA 含量也不相同。Wardell(1976)利用薄层培养证明了成花的烟草顶端细胞中的 DNA 含量约高于基部营养生长茎组织细胞的 6~10 倍,而且开花植株的 DNA 提取物能对营养生长植株的开花起一定作用。因此,各层细胞合成 DNA 的强度不同可能是决定各层细胞离体后能保持花芽分化的原因之一,也可能 DNA 只是成花的触发者,而不是它引起的反应^[7,26,29]。

3.2 研究植物激素的作用机制

3.2.1 植物激素结合蛋白。Tewavas(1978)认为,植物激素作用的强弱与其浓度无关,植物细胞对激素的敏感性是激素作用的控制因素,敏感性的强弱由细胞内激素受体的数目和亲和性决定^[30]。

高启祥等(2001)以烟草(*Nicotiana tabacum* L.)盛花期花梗薄层为材料,研究营养芽分化的不同时期生长素结合蛋白(ABH)在组织与细胞中的分布变化。免疫荧光标记结果表明,烟草花梗中 ABH 主要分布于表皮及亚表皮 1~2 层细胞内。不同分化期 ABH 在烟草花梗薄层原生质体中的表达不同,细胞分化旺盛期 ABH 的表达最强,分化后期 ABH 的表达有所减弱;Western Blotting 结果表明,ABH 多克隆抗血清与烟草花梗薄层细胞及分化过程中,26 kD 蛋白有免疫交叉反应^[31]。

SAHH(Sadenosyl-Lhomocysteine hydrolase)是一种 CTK 结合蛋,它通过调节细胞内 SAH/SAM 比例来调节细胞内转甲基作用,影响基因表达,从而调节形态发生。Tanaka 等(1997)发现导入反义 SAHH 的烟草表现植株矮化,顶端优势削弱,侧芽数增加,叶片衰老延缓等 CTK 的典型生理效应。检测结果显示,形态发生变化明显的转基因植株无 SAHH 基因的转录产物,DNA 甲基化程度低,叶片内源 CTK 水平高^[32]。

3.2.2 植物激素调节的开花相关基因的克隆和鉴定。Meks 等(1989)用³²P 标记烟草成花芽和营养芽 TCL 的 cDNA 进行 cDNA 文库的差异筛选,分离到花诱导期间优先或特异表达的 5 个基因家族(FB7-1~FB7-5),而在培养前的 TCL 中未见其相应的转录产物。在实生苗花前分生组织和花分生组织中发现 FB7 和 FB2 的转录产物,而营养分生组织和幼嫩的分生组织中没有;在花形成前和花形成期植株的根中可检测到 FB7-1、FB7-2、FB7-5 的大量转录产物,而在成根 TCL 和幼龄植株的根中则没有^[28]。

Tanaka 等(1996)采用差异筛选,在烟草 TCL 的花芽形成早期分离到含编码 SAHH 基因(DDBJ)的 cDNA 克隆,并以该 cDNA 为探针从烟草基因组文库中分离到 DDBJ。Northern Blotting 分析显示,DDBJ 在雌蕊和根中的表达量最大,并能受

KT 和 IAA 诱导表达^[33]。

4 目前薄层培养研究中存在的问题

薄层细胞培养有助于认识发育过程的本质,获得与植物器官分化、发育相关的重要信息,也可以克服某些植物的离体再生障碍。但目前对培养基的选择、供试材料的选择、供体植株的状态、内源生长物质的质量和数量都没有系统的研究,多数情况下凭一般组织培养的经验进行。薄层培养的操作较普通组织培养复杂,也影响了其在生产上的应用。对细胞薄层培养进行简化或使其操作程序化有助于其大规模推广和应用领域的拓宽。

参考文献

- [1] 张丕方,王琦.烟草薄层培养中细胞早期动态的研究[J].植物学报,1989,31(6):422-426.
- [2] 赵云鹏,郭维明,陆红梅.细胞薄层培养在植物激素调节形态发生研究中的应用[J].植物生理学通讯,2003,39(4):385-390.
- [3] MADSEN MH, NAUERBY B, FREDERIKSEN C G et al. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by the thin cell layer model system: Influence of explant culture media on rooting and plantlet formation[J]. Acta Agric, 1998, 48: 58-64.
- [4] 陈延速,张军,夏宁邵,等.香蕉横切薄层培养(TCL)及植株再生[J].福建果树,2001,117(3):22.
- [5] 李文安,徐瑞娟,陈永宁.烟草的不同器官薄层培养形成花芽的研究[J].实验生物学报,1989,22(4):386-391.
- [6] 李颖章,韩碧文.细胞薄层培养及形态建成(综述)[J].北京农业大学学报,1990,16(2):157-160.
- [7] 王鸿鹤,黄学林.薄层培养的应用现状与前景[J].植物学通报,1999,16(6):631-635.
- [8] 许萍,王琦,陈小村,等.烟草表皮细胞薄层培养系统中多种组织器官发生的研究[J].武汉植物学研究,1997,15(1):1-4.
- [9] 陈永宁,李文安.薄层细胞培养在细胞分化中的应用[J].细胞生物学杂志,1989,11(2):64-68.
- [10] DUONG T N, BU V L, TRANT V. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin[J]. In Vitro Cell Dev Biol (Hart), 2001, 37: 44-49.
- [11] TRANT V. Direct flower reformation from superficial tissues of small explant of *Nicotiana tabacum* L. [J]. Harta, 1973, 115: 87-92.
- [12] VAN DE, CROES AF, KEMP A, et al. Development of flower buds in thin cell layer cultures of floral stalk tissue from tobacco: Role of hormones in different stages[J]. Physiol Hart, 1984, 61: 114-118.
- [13] BU V L, DUONG T N, TRANT V. Hart production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulb explants of *Lilium longiflorum* in vitro[J]. Comptes Rendus de l'Academie des Si, 1999, 322: 303-310.
- [14] BU V L, HANG P N T, ANH H L T et al. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (Orchidaceae) using thin cell layers[J]. Hart Growth Regul, 1999, 28: 179-185.
- [15] BU V L, THANH H N, ANH H L T, et al. High frequency shoot regeneration from trifoliate orange (*Forticrus trifoliate* L. Raf.) using the thin cell layer method[J]. Comptes Rendus de l'Academie des Si, 1999, 322: 1105-1111.
- [16] FU Y F, HAN Y Z, ZHAO D G, et al. Zealaterone and flower bud formation in thin cell layers of *Nicotiana tabacum* L. [J]. Hart Growth Regul, 2000, 30: 271-274.
- [17] 李颖章,韩碧文.菊苣薄层培养花芽、营养芽分化中内源激素的动态变化[J].植物学报,1996,38(2):131-135.
- [18] 李颖章,韩碧文.菊苣体内成花梯度与内源激素的关系[J].植物生理学通讯,1995,31(1):29-31.
- [19] GENDY C, TIBURDO AF, TRANT V. Control of plant growth and development[J]. Acta Hort, 1993, 323: 261-277.
- [20] 李颖章,张会,韩碧文.薄层培养花芽分化中蛋白质含量的变化(简报)[J].北京农业大学学报,1994,20(4):354.
- [21] 陈永宁,李文安.薄层细胞培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,1989(1):58-59.
- [22] 周吉源,赵洁,杨和平,等.油菜薄层细胞培养中不同光质对愈伤组织诱导和增殖的效应[J].华中师范大学学报:自然科学版,1992,26(1):77-81.
- [23] 过全生.杨树叶薄层培养中不定芽形态发生的细胞组织学研究[J].植物学报,1997,39(12):1131-1137.
- [24] 李颖章,韩碧文.薄层培养的菊苣不定根分化中内源 IAA 和细胞分裂素的动态变化:简报[J].植物生理学通讯,1995,31(2):97-99.

(上接第4864页)

- [25] 许萍, 金承志, 张丕方. 烟草表皮细胞薄层培养中第一次无丝分裂时的核及核外微丝骨架变化的观察[J]. 复旦学报: 自然科学版, 1997, 36(5): 560 - 564.
- [26] 许萍, 金承志, 张丕方. 烟草薄层培养早期细胞核形态与核DNA含量变化的研究[J]. 复旦学报: 自然科学版, 1997, 36(5): 555 - 559.
- [27] 周吉源, 赵洁, 杨和平, 等. 油菜薄层细胞培养中形态发生的细胞组织学研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 1991, 25(1): 73 - 78.
- [28] 李颖章, 韩碧文. 薄层培养的菊苣花梗诱导花芽分化早期超微结构的变化[J]. 中国农业大学学报, 1997, 2(1): 1 - 5.
- [29] MEEKS WD, DENNIS ES, TRANT V, et al. Tobacco genes expressed during *in vitro* floral initiation and their expression during normal plant development[J]. *Plant Cell*, 1989(1): 25 - 35.
- [30] 曹国仪, 唐锡华. 烟草薄层培养直接形成花芽及其极性现象[J]. 植物生理学通讯, 1988(3): 47 - 49.
- [31] TREWAVAS AJ. A critical appraisal[C]// HOAD GA, LENTON J R, Jackson MB. *Hormone Action in Plant Development*. London: Butterworths, 1978: 19 - 38.
- [32] 高启祥, 李颖章, 刘淑兰. 烟草薄层培养生长素结合蛋白ABP1的定位和ABP1在细胞分化中的变化[J]. 植物学报, 2001, 43(10): 1023 - 1080.

- [33] TANAKA H, MASUTA C, UEHARA K, et al. Morphological changes and hyponmethylation of DNA in transgenic tobacco expressing antisense RNA of the S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene[J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 981 - 986.
- [34] TANAKA H, MASUTA C, KATAOKA J, et al. Inducible expression by plant hormones of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene from *Nicotiana tabacum* during early flower bud formation *in vitro*[J]. *Plant Sci*, 1996, 113: 167 - 174.
- [35] 李颖章, 韩碧文. 薄层培养的菊苣不定根分化中内源IAA和细胞分裂素的动态变化[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(2): 97 - 99.
- [36] ALTAMURA MM, CAHTAN F. The role of hormones on morphogenesis of thin layer explants from normal and transgenic tobacco plants[J]. *Physiol Plant*, 1992, 84: 555 - 560.
- [37] CARVALHO MHC, BU VL, ZULYF Y, et al. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin layer culture and silver nitrate[J]. *Plant Sci*, 2000, 159: 223 - 232.
- [38] TRANT V. *In vitro* control of de novo, flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissue[J]. *Nature*, 1973, 246: 44 - 45.
- [39] TRANT V. Molecular aspects of flowering[C]// HAEDING J, SINGH F, M JNM. *Genetics and Breeding of Ornamental Species*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1991: 253 - 269.